

**DIE BINDUNGSRATE VON 14 SUBSTANZEN
AN MENSCHLICHEM MUSKELHOMOGENAT**

HUBERT BERKTOLD

1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554827_0118

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie
und Toxikologie der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. W. Forth

Die Bindungsrate von 14 Substanzen an menschlichem

Muskelhomogenat

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hubert Berktold

aus

Burgberg/Allgäu

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Kurz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Forth

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.2.87

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. H. Kurz für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Ausführung der Arbeit.

Herrn Dr. med. habil. B. Fichtl danke ich für seine oft hilfreiche Beratung in fachlichen Fragen.

Mein besonderer Dank gilt auch Frl. U. Schwaiger für ihre technische Unterstützung und die freundschaftliche Atmosphäre im Labor.

Inhaltsübersicht

1)	Problemstellung.....	S.1
2)	Methodik.....	S.2
	2.1) Herstellung des Muskelhomogenates.....	S.2
	2.2) Ultrafiltration.....	S.4
	2.3) Substanzen und Nachweismethoden.....	S.5
	2.4) Berechnung des gebundenen Anteils.....	S.7
3)	Ergebnisse.....	S.9
4)	Diskussion.....	S.11
	4.1) Herstellung des Muskelhomogenates.....	S.11
	4.2) Ultrafiltration.....	S.11
	4.2.1) Adsorption.....	S.13
	4.2.2) Siebeffekt.....	S.13
	4.2.3) Membranladung.....	S.14
	4.2.4) Donnan Effekt.....	S.14
	4.3) Temperaturabhängigkeit der Bindung.....	S.15
	4.4) Einfluß der Homogenatkonzentration auf die Bindung.....	S.15
	4.5) Vergleich in vivo - in vitro Messung....	S.16
	4.6) Vergleich der Muskelbindung der Substan- zen bei verschiedenen Spezies.....	S.16
	4.7) Zusammenhang Muskelbindung - Plasma- bindung.....	S.20
	4.8) Beziehung der Muskelbindung zum Vertei-	

	lungskoeffizienten Wasser/Lipophile Phase.....	S.20
4.9)	Zusammenhang zwischen der Bindung an Muskelhomogenat und dem Verteilungs- volumen.....	S.22
4.10)	Zusammenhang zwischen Bindung an Mus- kelhomogenat und Metabolisation.....	S.26
5)	Zusammenfassung.....	S.28
6)	Literaturverzeichnis.....	S.29

1) Problemstellung

Die Gesamtkörperflüssigkeit bildet nach dem Kompartimentmodell drei Flüssigkeitsräume:

- a) Intravasale Flüssigkeit (5% des Körpergewichts)
- b) Interstitialflüssigkeit (15% des Körpergewichts)
- c) Intrazellulärflüssigkeit (40% des Körpergewichts)

Die Wände der Blutkapillaren, wie auch allgemein die Zellmembranen, welche die drei Flüssigkeitsräume trennen, können von vielen Substanzen, auch von Pharmaka, durch Diffusion, Filtration, aktiven Transport, Phagocytose und Pinocytose durchdrungen werden (Ganong 1974).

Somit stehen die drei Kompartimente auch zur Verteilung von dem Körper zugeführten Pharmaka zur Verfügung.

Die Verteilung der Substanzen findet jedoch nicht nur im freien Körperwasser statt, viele Substanzen werden auch von Eiweißkörpern gebunden.

Zahlreiche Autoren haben sich mit der Plasmaeiweißbindung von Pharmaka beschäftigt, wie Burns et al. (1953), Rieder (1963), Scholtan (1961/ 1964 / 1968), um nur einige zu nennen. Die Bindung von Pharmaka an die Eiweißkörper des Blutplasmas beeinflusst die Pharmakokinetik des jeweiligen Medikamentes und steht in Wechselwirkung mit der Bindung anderer, gleichzeitig beim selben Patienten, angewendeter Pharmaka (Thorp 1964), (Martin 1967), (Brodie 1966), (Keen 1971).

Da sich die Pharmaka in allen drei Flüssigkeitsräumen verteilen, stehen auch die Eiweißkörper des übrigen Kör-

pergewebes zur Bindung mit Pharmaka zur Verfügung. Dem Muskelgewebe mit einem Anteil von 40% am Gesamtkörpergewicht fällt hierbei eine Schlüsselstellung zu. Dennoch gibt es nur wenige Arbeiten, in denen die Muskelbindung bestimmt wurde (Schanker und Morrison 1966), (Kurz 1966), (Fichtl und Kurz 1978), (Conway et al. 1979), (Fichtl et al. 1980), (Igari et al. 1982), (Lin et al. 1982).

Die Aufgabe meiner Arbeit bestand darin, die Muskelbindung für eine Serie von relevanten Substanzen in vitro zu bestimmen. Dabei war es wichtig, die Bestimmung an menschlichem Gewebe vorzunehmen, da von anderen Untersuchern (Scholtan 1961), (Schach und Yeary 1963), (Friemel 1968), Unterschiede in der Plasmabindung bei verschiedenen Spezies festgestellt wurden. Somit war zu erwarten, daß auch bei der Muskelbindung diese Unterschiede auftreten würden.

2) Methodik

2.1) Herstellung des Muskelhomogenates

Für die Bindungsversuche wurde Muskulus psoas von Unfalltoten verwendet, bei denen bekannt war, daß sie kurz vor ihrem Tod nicht mit Medikamenten behandelt worden waren. Die Muskelproben wurden bis zum Versuch in gefrorenem Zustand, in Plastikfolie luftdicht verpackt aufbewahrt. Vor der Verarbeitung zu Homogenat wurden die Muskeln auf-

getaut und von Fett und Bindegewebe befreit. Anschließend wurde das Gewebe durch einen Fleischwolf getrieben und gewogen. Der Muskelbrei wurde nun mit 80% seiner Masse an Phosphatpuffer (0,125 m Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 pH 7) vermischt und anschließend homogenisiert ¹⁾ .

Die Wasserkühlung des Gerätes und eingehaltene Pausen beugten einer Überhitzung des Homogenates vor. Da mehrere Homogenate hergestellt wurden, jedoch die Größe der Homogenatfragmente bei den verschiedenen Homogenaten gleich sein sollte, wurde die Gesamtdauer des Homogenisationsvorganges entsprechend der eingesetzten Homogenatmenge gewählt.

Das fertige Homogenat wurde in Portionen in Plastikfolie eingeschweißt und bei -40°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Am Tag der Weiterverarbeitung wurde, nachdem das Homogenat wieder aufgetaut war, der pH- Wert gemessen. Der pH- Wert der verschiedenen Homogenate lag zwischen 6,33 und 6,48. Die unterschiedlichen pH- Werte könnten durch verschiedene Grade der postmortalen Autolyse bedingt sein.

Das Homogenat wurde anschließend unter laufender Kontrolle mit 20 prozentiger Na_2CO_3 - Lösung auf pH 7,0 titriert. Dieser Wert entspricht dem physiologischen pH- Wert des Muskels in vivo (Bittar 1964), (Waddel und Bates 1969), (Roos und Boron 1981). Von diesem Homogenat wurden 3 Proben zur Bestimmung des Wassergehaltes bei 105°C , bis zur Gewichtskonstanz, ca. 5 Stunden getrocknet.

1) Homogenisator, Firma Groschop und Co., Virsen

2.2) Ultrafiltration

Die zur Bestimmung des nichtgebundenen Anteils benötigte Substanzlösung wurde durch Ultrafiltration gewonnen. Dazu wurden Säckchen aus Visking Dialysierschlauch ¹⁾ durch doppeltes Verknöten gebildet. Die Dialysierschläuche wurden vorher in demineralisiertem Wasser 1,5 Stunden gewässert. Das demineralisierte Wasser wurde während der 1,5 Stunden zweimal erneuert. Nach 1,5 Stunden wurden die Säckchen luftgefüllt in einer feuchten Kammer bis zur Weiterverwendung aufbewahrt.

Die Schläuche wurden mit je 15 ml Phosphatpufferlösung (0,125 M Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 pH 7) mittels einer Glaspipette oder 10 g Homogenat mit einer Einmalspritze gefüllt.

Der gefüllte Schlauch kam in einen Siebeinsatz und dieser in ein Zentrifugenglas. Das System wurde mit Parafilm luftdicht verschlossen. Bis zur Filtration wurden die beschickten Zentrifugengläser bei 4°C im Kühlraum aufbewahrt.

In einer gekühlten Zentrifuge ²⁾ (2 - 4°C) wurden bei einem Filtrationsdruck von 270 g ca. 2 - 3 ml Pufferfiltrat b.z.w. ca. 2ml Homogenatfiltrat gewonnen. Der Filtrationsvorgang für die oben genannten Filtratmengen,

1) Typ 20/32, bezogen durch Serva-Feinbiochemica, Heidelberg

2) Firma W. Stock Maschinenbau, Marburg

benötigte etwa 4 Stunden für die Pufferfiltrate und ca. 9 Stunden für die Homogenatfiltrate.

2.3) Substanzen und Nachweismethoden

In Tabelle 1 sind die Substanzen aufgeführt, deren Bindung an Muskelgewebe bestimmt wurde.

a) Säuren	Molekulargewicht	pK _a
Sulfadimethoxin	310,27	6,3
Sulfamethoxydiazin	280,4	6,7
Sulfamethoxypyridazin	280,25	6,7
Sulfamoxol	267,24	7,4
Sulfisomidin	278,34	7,4
Sulfisoxazol	267,30	5,8
Oxyphenbutazon	342,38	4,7
Phenylbutazon	308,37	4,5
Sulfinpyrazon	404,48	2,8
b) Basen		
Alprenolol	249,34	9,63
Metoprolol	267,38	9,68
Pindolol	248,32	8,8
Propranolol	283,8	9,45
Toliprolol	223,32	8,57

Tabelle 1: Substanzen deren Muskelbindung bestimmt wurde, mit Molekulargewicht und pK_a - Wert.

Um die Berechnung des gebundenen Anteiles der Substanzen einfach zu gestalten und Fehlerquellen auszuschliessen, welche sich durch verschiedene Substanzkonzentrationen in Puffer und Homogenat hätten ergeben können, wurden die Substanzkonzentrationen in Puffer und Homogenat gleich gewählt.

Die Konzentrationen waren für die Sulfonamide und die β -Blocker 1×10^{-5} m, für die Pyrazolone 1×10^{-4} m. Der Anteil des Muskelgewebes am Homogenat betrug 0,5 g/ml.

Die Konzentrationen der Substanzen im Ultrafiltrat wurden photometrisch (Sulfonamide, Pyrazolone)¹⁾ und spektrofluorometrisch (β -Blocker)²⁾ bestimmt. Es wurden folgende Nachweismethoden angewandt.

Nachweismethoden

S u l f o n a m i d e

Sulfadimethoxin, Sulfamethoxydiazin, Sulfamethoxypyridazin, Sulfamoxol, Sulfisomidin, Sulfisoxazol
nach Bratton und Marshall (1939)

P y r a z o l o n e

Oxyphenbutazon, Phenylbutazon, Sulfinpyrazon
nach Burns et al. (1953)

1) Photometer PMQ 3 Zeiss BRD

2) Spectrofluorometer, Amino - Bowman

American Instrument Company, Inc. Silverspring Maryland
U.S.A

β - B l o c k e r

Alprenolol, Metoprolol, Toliprolol

nach Stock und Westermann (1965)

Pindolol

nach Pacha (1969)

Propranolol

nach Shand et al. (1969).

2.4) Berechnung des gebundenen Anteils

In Tabelle 2 sind die verwendeten Testansätze aufgeführt. Als Pufferlösung wurde bei Ansatz I und II derselbe Phosphatpuffer pH 7 wie zur Herstellung des Muskelhomogenates verwendet.

		Extinktion	Konzentration
		im Ultrafiltrat	
I)	15 ml Puffer ohne Substanz (Blindwert)	E_p^O	
II)	15 ml Puffer mit Substanz	E_p	c_p
III)	10 g Muskelhomogenat o. S.	E_m^O	
IV)	10 g Muskelhomog. mit S.	E_m	c_m

Tabelle 2: Ansätze zur Bestimmung des gebundenen Anteils.

Der Wassergehalt des Muskelhomogenates, sei W (ml/g)
und wurde wie folgt aus dem Mittelwert von jeweils drei
Proben berechnet (siehe 2.1).

a: Gewicht des leeren Gefäßes b: Gewicht des Gefäßes
mit ca. 0,8 g Homogenat pH 7,0 vor dem Trocknen

c: Gewicht des Gefäßes mit Muskelhomogenat pH 7,0 nach
dem Trocknen.

b - a Feuchtgewicht c - a Trockengewicht

$$\frac{c - a}{b - a} \times 100\% \times 0,9 = \text{Trockensubstanz in \%}$$

100% - % Trockensubstanz = Wassergehalt

0,9: Korrekturfaktor, da nach Bestimmung des Trockenge-
wichtes noch 1/10 des Volumens an Substanzlösung zuge-
setzt wurde.

Gesamtmenge im Ansatz $c_p \times 10$

nicht gebunden (frei) $c_m \times 10 \times W$

Der nicht gebundene Anteil berechnet sich somit nach

$$100 \times (c_m \times W / c_p) \% ; \quad \text{Gleichung 1}$$

der gebundene Anteil nach

$$100 \times (1 - c_m \times W / c_p) \% ; \quad \text{Gleichung 2}$$

Die Gültigkeit des Lambert - Beer'schen Gesetzes wurde
in der Literatur (Bratton und Marshall 1939),

für Sulfonamide und Pyrazolone beschrieben. Für
die β -Blocker wurden eigene Eichkurven erstellt, die das
Lambert - Beer'sche Gesetz im entsprechenden Konzentra-
tionsbereich erfüllten. Dadurch können die Konzentratio-
nen in Gleichung 1 und 2 durch die Extinktion ersetzt
werden.

Somit gilt:

$$\text{Bindung in \%} = \left(1 - \frac{E_m - E_m^O}{E_p - E_p^O} \times W \right) \times 100 \% \quad \text{Gleichung 3}$$

3) Ergebnisse

Für die Bindung an menschliches Muskelgewebe der 14 von mir untersuchten Substanzen, erhielt ich die in Tabelle 2 aufgeführten Werte.

Das Alter der Unfalltoten, deren Gewebe verwendet wurde, lag zwischen 24 Jahren und 65 Jahren, bei einem Durchschnittsalter von 49,5 Jahren. Es handelte sich ausschließlich um Männer.

Die Bindung wurde bei den Sulfonamiden teilweise an Homogenat bestimmt, das von einer einzelnen Leiche stammte und teilweise an Homogenat, das aus Muskeln von drei Toten bereitet wurde. Bei den Bestimmungen des gebundenen Anteils am gleichen Homogenat an verschiedenen Versuchstagen, ergaben sich gleich hohe Streuungen der Bindungswerte, wie beim Vergleich der Werte von unterschiedlichen Homogenaten. Die Bestimmung der Bindungswerte der anderen untersuchten Substanzen wurde grundsätzlich an gepoolten, aus den Muskeln mehrerer Individuen bereiteten Homogenaten, durchgeführt.

Die photometrisch gemessenen Werte zur Bestimmung des gebundenen Anteils streuten bei den Sulfonamiden insgesamt stärker, als bei den anderen Substanzen, die auch photometrisch (Pyrazolone) oder spektrofluorometrisch (β -Blocker), bestimmt wurden.

S u b s t a n z Gebundener Anteil in % $\bar{n}$ Ionisierter Anteil in % bei pH 7,0

Sulfadimethoxin	56,00 $\pm$ 3,13	8	66
Sulfamethoxydiazin	50,73 $\pm$ 3,62	7	66
Sulfisomidin	40,65 $\pm$ 2,20	7	24
Sulfisoxazol	40,91 $\pm$ 3,36	6	99
Sulfamethoxypyridazin	43,49 $\pm$ 3,19	5	66,7
Sulfamoxol	14,31 $\pm$ 2,55	5	28,5
Phenylbutazon	59,08 $\pm$ 0,36	3	99,68
Oxyphenbutazon	57,66 $\pm$ 1,20	3	99,5
Sulfinpyrazon	51,40 $\pm$ 2,18	4	100
Toliprolol	39,29 $\pm$ 0,47	3	97,38
Metoprolol	36,74 $\pm$ 2,75	4	99,79
Alprenolol	74,93 $\pm$ 0,93	4	99,77
Pindolol	78,29 $\pm$ 2,96	4	98,39
Propranolol	89,7 $\pm$ 0,44		97,38

Tabelle 2: Gebundener Anteil der 14 untersuchten Substanzen in Prozent mit Standarderror.

$\bar{n}$: Anzahl der Versuche (Je Versuch wurden 3 Proben gemessen). Zusätzlich ist der ionisierte Anteil der Substanzen bei pH 7,0 in Prozent angegeben.

4) Diskussion

4.1) Herstellung des Muskelhomogenates

Schon bei der Herstellung des Muskelhomogenates müssen Faktoren berücksichtigt werden, die die Bindungskapazität beeinflussen.

- Der Zersetzungsgrad des Muskels.

Nach Fichtl und Kurz (1978) änderte sich die Bindungsrate von Muskelgewebe von Mensch und Ratte, welches 12 h und 36 h bei Raumtemperatur liegen gelassen wurde, für Sulfadimethoxin nicht.

- Fettgehalt des Muskelgewebes.

Nach Entfettung des Muskelhomogenates verhält sich die Bindungskapazität bei verschiedenen Substanzen unterschiedlich. Teilweise sinkt sie, z.B. für Propranolol (Base) und teilweise steigt sie, z.B. für Sulfadimethoxin (Säure) (Fichtl et al. 1980).

- Grad der Homogenisation.

Wie Fichtl (1974) fand, ist die Bindung nach einem oder nach zwei Homogenisierungsschritten unverändert. Ebenso zeigt die gute Übereinstimmung der Bindungswerte von inkubierten Rattenzwerchfellen und deren Homogenaten (Filous 1977), daß der Grad der Homogenisierung keinen entscheidenden Einfluß auf die Bindung hat.

4.2) Ultrafiltration

Unter den verschiedenen Methoden zur Bestimmung des nicht gebundenen Anteiles der Substanzen, wird die Dialyse als die Methode mit den geringsten Fehlerquellen beschrieben.

ben (Kurz und Trunk 1967, Kurz et al. 1977). Die Gleichgewichtseinstellung der Bindung erfolgt dabei durch Diffusion. Die Zeitdauer, bis ein Bindungsgleichgewicht entsteht, ist verhältnismässig lang. Die Dialyse sollte nur bei höher verdünnten Proteinlösungen angewendet werden (Weder und Bickel 1970). Die Dialyse bietet sich an, wenn nur wenig Gewebe oder Protein zu Bindungsversuchen zur Verfügung steht.

Die Ultrafiltration hat den Vorteil, daß sie auch bei hoch konzentrierten Gewebehomogenaten noch praktikabel ist. Die Handhabung ist einfach, die Zeitdauer bis man genügend Ultrafiltrat für Bindungsanalysen gewonnen hat, kurz. In der vorliegenden Arbeit wurden für 2 - 3 ml Pufferfiltrat etwa 4 Stunden, für ca. 2 ml Muskelhomogenatfiltrat etwa 8 - 9 Stunden benötigt.

Kurz et al. (1977) bewerteten die Methoden zur Bestimmung der Eiweißbindung von Pharmaka: Gleichgewichtsdialyse, Ultrafiltration, Ultrazentrifugation, Gelfiltration. Sie fanden, daß unter Berücksichtigung gewisser Bedingungen, sich alle vier Methoden in ihrer Reproduzierbarkeit nur gering unterscheiden. Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse, scheinen die durch Gleichgewichtsdialyse erhaltenen Werte den wirklichen Werten am nächsten zu kommen.

Die Genauigkeit der Ultrafiltration wird durch folgende Fehlerquellen beeinträchtigt (Kurz et al. 1977).

4.2.1) Adsorption

Die Substanzen können an die Filtermembranen adsorbiert werden. Dabei schwankt die Adsorption an das selbe Material von Experiment zu Experiment. Die Menge der adsorbierten Substanz wird umso größer, je höher die Substanzkonzentration ist. Der Anteil der adsorbierten Substanz sinkt jedoch bei steigender Konzentration, da jede Membran nur eine begrenzte Adsorptionskapazität hat.

4.2.2) Siebeffekt

Durch einen Siebeffekt der Filtrationsmembran ergibt sich eine Konzentrationsdifferenz zwischen Ultrafiltrat und Ausgangslösung. Die kleinen H_2O -Moleküle werden leichter und schneller filtriert als die Substanzmoleküle. Der Fehler beträgt ca. 2% bei einem Molekulargewicht (MG) von 300 und steigt rapide mit zunehmendem Molekulargewicht.

Der Siebeffekt steigt auch bei Zunahme des Filtrationsdruckes. Kurz et al. (1977) arbeiteten mit einem Filtrationsdruck von 0,5 bis 1,0 kg/cm². Sie erhielten eine gute Übereinstimmung der Bindungswerte im Vergleich von Ultrafiltration und Gleichgewichtsdialyse. Scholtan (1961) und v. Bruck und Kuhne (1962) arbeiteten mit einem Filtrationsdruck von 7,5 bis 10 kg/cm². Ihre Ergebnisse im Vergleich von Ultrafiltration und Gleichgewichtsdialyse waren unbefriedigend.

Die Porengröße der Filtrationsmembran darf zur Begrenzung des Siebeffektes nur eine schmale Variationsbreite aufweisen. Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Visking-Membranen, beträgt die Porenstärke 0,7 - 2,1 nm (Renkin 1955). Bei der Arbeit von v. Bruck und Kuhne (1962) lag sie bei 1 - 8 nm.

Ein zusätzlicher Siebeffekt tritt durch Proteinmoleküle der Gewebekomponenten auf, die ganz oder teilweise die Porenlichtung der Membranen verlegen (v. Bruck und Kuhne 1962, Scholtan 1962).

4.2.3) Membranladungen

Positive oder negative Ladungen der Membran können die Ultrafiltration von ionisierten Molekülen beeinflussen (Willbrandt 1935). Die bei unseren Versuchen verwendeten Membranen sind nahezu ungeladen (Craig und Ansevin 1963).

4.2.4) Donnan Effekt

Nach Keen (1966) muß bei der Ultrafiltration der Donnan Effekt berücksichtigt werden. Durch negativ geladene Proteine im Homogenat tritt ein Rückhalteeffekt für Basen und eine verstärkte Filtration für Säuren auf. der Donnan Effekt betrifft besonders hoch ionisierte und schwach gebundene Substanzen.

Zusammenfassend erkannten Kurz et al. (1977), daß die Pharmakonzentration umso höher wird, je mehr filtriert wird und je länger die Filtration dauert. Dabei ist der

Anstieg der Pharmakonkonzentration im Filtrat umgekehrt proportional zur Eiweißbindung des betreffenden Pharmakons.

Bei Berücksichtigung der oben genannten Grenzen, erhielten Kurz et al. (1977) keine signifikanten Unterschiede der Bindungswerte bei Dialyse und Ultrafiltration.

4.3) Temperaturabhängigkeit der Bindung

Die unspezifische Bindung der Substanzen an Gewebehomogenate ist weitgehend temperaturunabhängig (Wosilait 1968), (Dollery und Junod 1976), (Anderson et al. 1978), (Fichtl et al. 1980). Bei der vorliegenden Arbeit wurde bei einer Temperatur von 4°C experimentiert. Damit können auch Metabolisationsvorgänge unterdrückt werden (Sheik 1972), (Ludden et al. 1976), (Anderson et al. 1978).

4.4) Einfluß der Homogenatkonzentration auf die Bindung

Unverdünntes Muskelhomogenat macht bei der Verarbeitung durch seine zähflüssige, pastenartige Konsistenz zahlreiche Probleme. Es kann nicht mit Pipetten abgemessen werden. Außerdem ist die Zeitdauer bis zur Gewinnung von Ultrafiltrat sehr lang. Um die Verarbeitung einfacher zu gestalten, wurde in dieser Arbeit mit verdünntem Homogenat, Muskelanteil 50%, gearbeitet. Fichtl und Kurz (1980) zeigten, daß die Substanzbindung von 6 Pharmaka an 50 prozentiges Muskelhomogenat vom Kaninchen, linear für 90 prozentiges Homogenat extrapoliert werden

kann. Bindungswerte für stärker verdünnte Homogenate führten beim Extrapolieren zu einer Überbestimmung der Bindungsrate von Propranolol und Imipramin. Lin et al. (1982) fanden bei Versuchen mit Plasma, Niere und Leber bei 3 verschiedenen Eiweißkonzentrationen, daß die Bindung der Gewebe- b.z.w. Plasmakonzentration direkt proportional ist.

4.5) Vergleich in vivo - in vitro Messung

Der gebundene Anteil wurde an Homogenaten in vitro gemessen. Das bedeutet, daß im Gegensatz zum in vivo Modell, aktive Transportprozesse ausgeschaltet, Zellmembranen zerstört sind und sich somit Änderungen in der Verteilung abzeichnen könnten. Speziell die Arbeit von Filous (1977) zeigte, daß zwischen Homogenat und intaktem, wenn auch totem Muskel, keine Unterschiede in der Bindung bestehen. Über die gute Übereinstimmung von in vivo und in vitro Experimenten berichten auch Lin et al. (1982).

4.6) Vergleich der Muskelbindung der Substanzen bei verschiedenen Spezies

Beim Vergleich des Quotienten von gebundenem zum freien Anteil der jeweiligen Substanz B/F, beim Menschen, ergibt sich eine enge Korrelation mit den Werten von Kaninchen und Ratte. In Abbildung 1 sind die Logarithmen von B/F

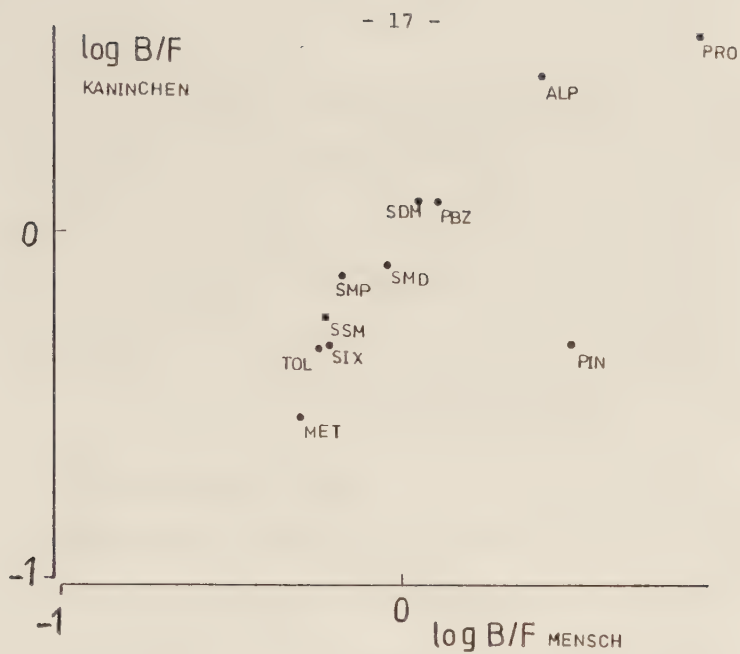


Abb. 1

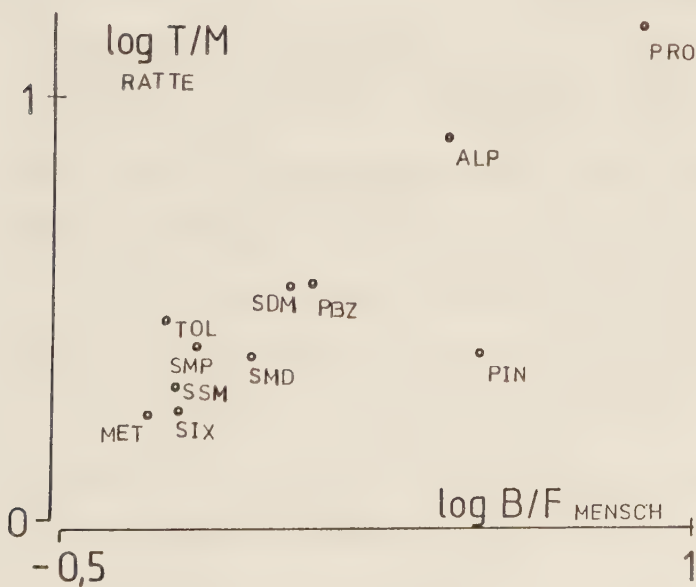


Abb. 2

Abb. 1 B/F: Quotient aus gebundenem Anteil B zum freien Anteil F der jeweiligen Substanz für Muskelhomogenat von Mensch und Kaninchen. $r_s = 0,789$ $p < 0,005$
Bedeutung der Abkürzungen: ALP Alprenolol, MET Metoprolol, PBZ Phenylbutazon, PIN Pindolol, PRO Propriolol, SDM Sulfadimethoxin, SIX Sulfisoxazol, SMD Sulfamethoxydiazin, SMP Sulfamethoxypyridazin, SMX Sulfamoxol, SSM Sulfisomidin, TOL Toliprolol.

Abb. 2 T/M Ratte: Quotient aus der Gesamtkonzentration der jeweiligen Substanz in den inkubierten Rattenzwerchfellen und der Gleichgewichtskonzentration in der Inkubationslösung. B/F: Quotient aus gebundenem und freiem Substanzanteil an menschlichem Muskelhomogenat. Abkürzungen siehe Abb. 1.

der Muskelhomogenatbindung für Mensch und Kaninchen graphisch dargestellt . Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman beträgt $r_s = 0,789$, $p < 0,005$.
Abbildung 2 zeigt die graphische Darstellung der Bindungswerte für Mensch und Ratte. T/M steht für den Quotienten aus der Gesamtkonzentration im inkubierten Zwerchfell der Ratte und der Gleichgewichtskonzentration in der Inkubationslösung. Der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient beträgt hier $r_s = 0,718$, $p < 0,01$. Die Bindungswerte für Kaninchenmuskelhomogenat und inkubierte Rattenzwerchfelle wurden der Arbeit von Fichtl (1983) entnommen.

Bei den Abbildungen 1 und 2 weicht der Bindungswert für Pindolol stark von der gedachten Korrelationsgeraden ab. Auch bei anderen Korrelationen wird das später deutlich werden.

Zum Ausschluß eines systematischen Fehlers wurde eine Kontrolle durchgeführt. Dabei wurde eine Bindungsmessung mit Menschen- und Kaninchenmuskel parallel durchgeführt. Ich fand bei dieser Kontrollmessung Bindungswerte für Kaninchenmuskel in der Größenordnung, wie sie Fichtl (1983) angibt. Die Bindungswerte für Menschenmuskel lagen wiederum in der von mir gefundenen Größenordnung. Demnach scheint eine Besonderheit im Bindungsverhalten von Pindolol vorzuliegen.

Wird Pindolol für beide Korrelationen vernachlässigt, so ergibt sich für die Werte der Abbildung 1 $r_s = 0,985$, $p < 0,001$ und jene der Abbildung 2 $r_s = 0,855$, $p < 0,005$. Die hohe Übereinstimmung der Bindungswerte am Muskelgewebe von Mensch und Tier, sollte wichtige Anhaltspunkte für den Ersteinsatz von Pharmaka bei Menschen durch Tierexperimente erlauben.

4.7) Zusammenhang Muskelbindung - Plasmabindung

Bei der Gegenüberstellung von Bindungswerten für menschliches Plasma aus der Literatur (Goodman und Gilman 1979), (Kurz und Friemel 1967), (Anton 1960), (Rieder 1963) läßt sich keine Korrelation mit den Muskelbindungswerten erkennen. Auch für die einzelne Substanzgruppe der Sulfonamide tritt keine Korrelation auf. Aufgrund des engen Zusammenhanges zwischen der Muskelbindung verschiedener Spezies und der fehlenden Korrelation zwischen Plasmabindung und Muskelgewebebindung bei der gleichen Art, kann vermutet werden, daß sich die Substanzbindung an Gewebe an anderen Strukturen vollzieht, als die Bindung an eine zellfreie Eiweißlösung wie Plasma. Auch die Plasmen unterschiedlicher Tierarten gleichen in ihren Substanzbindungseigenschaften nicht dem menschlichen Plasma (Kurz und Friemel 1967).

4.8) Beziehung der Muskelbindung zum Verteilungskoeffizienten Lipophile Phase/Wasser

Von einigen Autoren wird auf die Beziehung zwischen Substanzbindung an Proteine und Lipidlöslichkeit der Substanz hingewiesen (Leo et al. 1971), (Hansch und Leo 1979), (Seydel und Schapper 1982), (Fichtl 1983). Bei der Gewebebindung sollte die Lipidlöslichkeit eine größere Rolle spielen als bei der Plasmabindung, da die Zellmembranen aus Proteinen und Lipiden aufgebaut sind. Als geeignetes Modell zur Bestimmung der Lipidlöslich-

keit im Vergleich zur Proteinbindung wird der Verteilungskoeffizient (VK) zwischen Oktanol und Puffer genannt (Smith et al. 1975), (Hansch und Leo 1979).

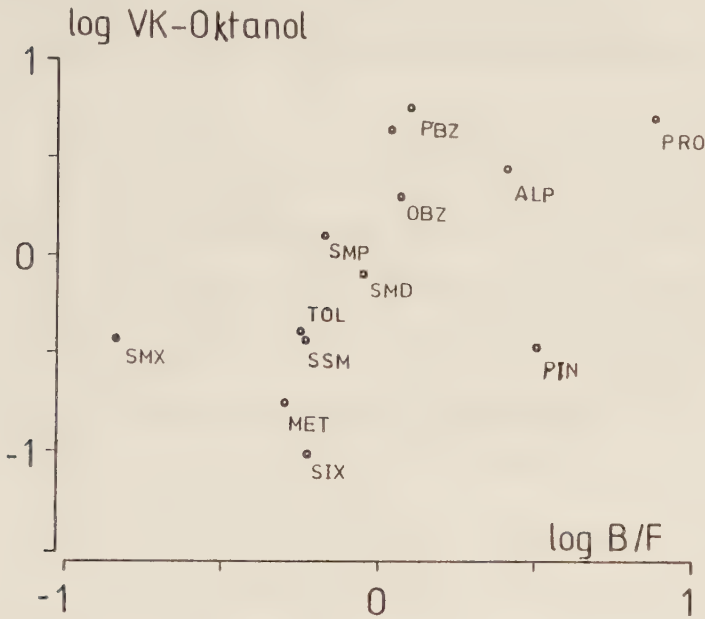


Abb. 3 Graphische Darstellung des Zusammenhanges zwischen dem Quotienten des gebundenen zum freien Anteil B/F für die Substanzen und deren Verteilungskoeffizienten VK zwischen Oktanol und Puffer, $r_s = 0,5899$, $p < 0,005$. Erklärung der Abkürzungen siehe Abbildung 1.

In Abbildung 3 ist der Logarithmus des Verteilungskoeffizienten VK Oktanol gegen den Logarithmus des Quotienten aus gebundenem und freiem Anteil B/F an menschliches Muskelhomogenat, graphisch dargestellt. Die Werte der Verteilungskoeffizienten VK Oktanol entstammen der Arbeit

von Fichtl (1983). Bei der Korrelation der Wertepaare nach Spearman ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von $r_s = 0,5899$, $p < 0,05$. Auch bei dieser Graphik fällt auf, daß Pindolol stark aus der Reihe fällt. Wird die Korrelation ohne Pindolol berechnet, so ergibt sich $r_s = 0,839$, $p < 0,001$.

Unter der Annahme, daß nur unionisierte Moleküle der Substanzen sich in Lipiden lösen, berechnete Fichtl (1983) mit Hilfe des pK_a - Wertes der jeweiligen Substanz, den Verteilungskoeffizienten VK_o Oktanol - Puffer für das ungeladene Molekül. Bei der Korrelation von VK_o Oktanol mit B/F ergibt sich $r_s = 0,566$, $p < 0,05$. Daraus geht hervor, daß nicht nur ionisierte, sondern auch unionisierte Moleküle gebunden werden.

4.9) Zusammenhang zwischen der Bindung an Muskelhomogenat und dem Verteilungsvolumen

Für jede Substanz läßt sich ein Verteilungsvolumen berechnen, das der Gleichung $V_d = \frac{D}{c_{po}}$ gehorcht.

(D : Dosis; c_{po} : fiktive Ausgangsplasmakonzentration zum Zeitpunkt $t = 0$, bei intravenöser Gabe)

Wird dieses Verteilungsvolumen auf das Körpergewicht bezogen, so ergibt sich das relative Verteilungsvolumen nach

nach der Gleichung $\frac{V_d (l)}{KG (kg)}$ (Gleichung 4).

Das Plasmavolumen des Menschen wird mit ca. 0,043 l/kg Körpergewicht angegeben. Substanzen, deren relatives Verteilungsvolumen größer als 0,043 l/kg KG ist, werden an Plasmaproteine gebunden, oder zusätzlich außerhalb des Plasmas verteilt und können somit den Intravasalraum verlassen.

Bei Substanzen, deren relatives Verteilungsvolumen größer ist als 1 l/kg KG, kann schon bei diesem einfachen Modell davon ausgegangen werden, daß sie an Strukturen des Körpers gebunden werden. Solche Strukturen können Lipide, Zellmembranen der Gewebe, Zellorganellen, Kollagen und vieles anderes sein.

Für die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen werden von Klotz (1984) und Avery (1980) Daten zum Verteilungsvolumen angegeben. Diese Werte reichen von 0,12 - 0,15 l/kg KG für Phenylbutazon bis zu 5,6 l/kg KG für Metoprolol (Avery 1980). Damit sind die Verteilungsvolumina aller untersuchter Substanzen größer als das Plasmavolumen des Menschen. Das bedeutet, daß alle untersuchten Substanzen auch außerhalb des Intravasalraumes verteilt werden, vorausgesetzt, daß die Verteilungsvolumina über 0,043 l/kg KG nicht nur durch Plasmaproteinbindung gebildet werden.

Stellt man für die untersuchten Substanzen eine Korrelation nach Spearman zwischen den Bindungswerten an Muskulatur und dem Verteilungsvolumen (Avery 1980; Klotz

1984) auf, so ergibt sich $r_s = 0,063$ und somit kein Zusammenhang.

Wird für die Substanzen das Verteilungsvolumen der freien Substanz V_f , nach der Gleichung

$$V_f = \frac{V_d}{f_p} \quad \begin{array}{l} \text{(Verteilungsvolumen)} \\ \text{(freier Substanzanteil im Plasma)} \end{array} \quad \text{(Gleichung 5)}$$

berechnet, so erhalten wir damit das Verteilungsvolumen der Substanzmenge, die sich im Gewebe verteilen kann.

Diese Zahl ist deshalb sinnvoll, da sich jede Substanz zu einem bestimmten Anteil an Plasmaproteine bindet und somit dem zweiten Schritt, der Verteilung im Extravasa-
raum und der Bindung an Gewebe entzogen ist (Lin et al. 1982).

In Abbildung 4 ist der Quotient aus gebundenem und freiem Anteil B/F der Substanzen dem Verteilungsvolumen der freien Substanz graphisch gegenüber gestellt. Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman zeigt mit $r_s = 0,6$, $p < 0,05$ den Zusammenhang der Wertepaare an.

Wenn Metoprolol mit seinem hohen Verteilungsvolumen unberücksichtigt bleibt, ist $r_s = 0,830$, $p < 0,005$.

Da per deffinitionem $V_f = \frac{V_d}{f_p}$ (Gleichung 5) und V_d

zum Zeitpunkt $t = 0$ bestimmt wird, werden beim Wert von V_f spätere Gleichgewichtsverschiebungen der Substanzbindung von den Plasmaproteinen zum Gewebe nicht berücksichtigt. Nur der Anteil an Substanz, der nach Absättigung der Plasmaproteine noch frei ist, kann zum Zeitpunkt $t = 0$ an Gewebe gebunden werden.

Dieses Ergebnis drückt aus, daß die Muskulatur

mit einem Anteil von 40 % des Körpergewichtes einen hohen Anteil am extravasalen Verteilungsvolumen stellt. Der Zusammenhang zwischen Verteilungsvolumen der freien Substanz V_f und der Muskelbindung läßt sich durch folgende Gleichung ausdrücken:

$$\log V_f = a \times \log B/F + b$$

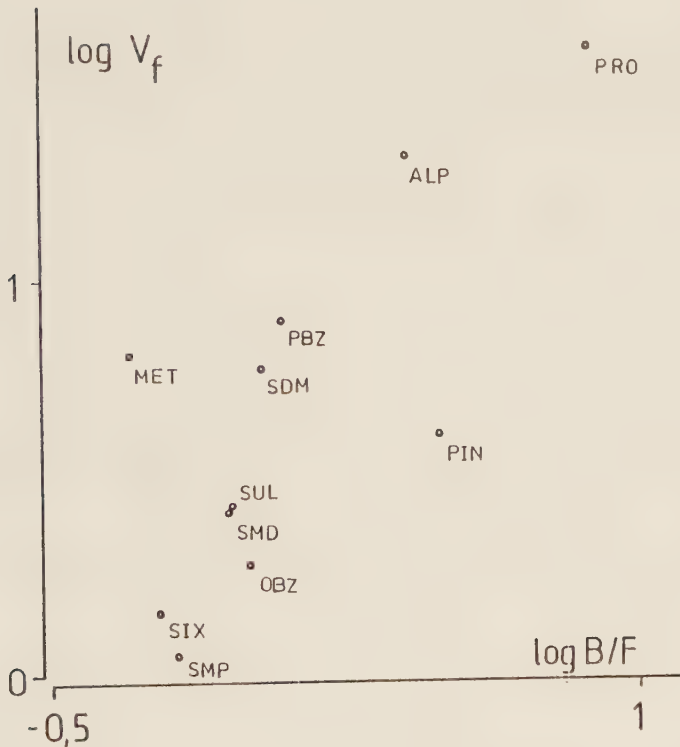


Abb. 4 Darstellung des Zusammenhanges zwischen dem Logarithmus des Quotienten aus gebundener und freier Substanz B/F und dem Verteilungsvolumen der freien Substanz V_f . $r_s = 0,6$, $p < 0,05$.

4.10) Zusammenhang zwischen Bindung an Muskelhomogenat und Metabolisation

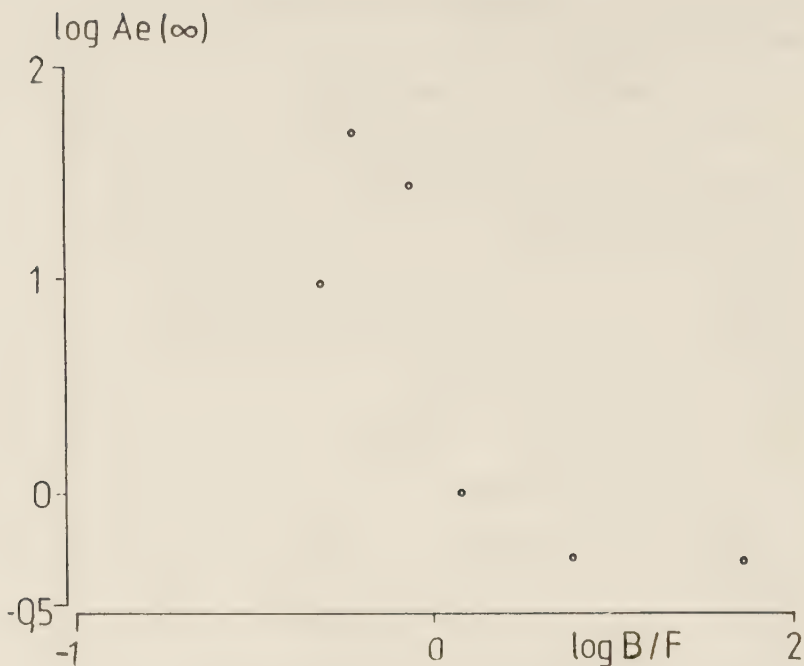


Abb. 5 Urinausscheidung unveränderter Substanz—Muskelgewebebindung. B/F: Quotient aus gebundenem und freiem Substanzanteil. $Ae(\infty)$: Menge der im Urin unverändert ausgeschiedenen Substanz bis zum Zeitpunkt unendlich in %. $r_s = -0,786$, $p < 0,05$

Gibaldi et al. (1978) fanden, daß die Gewebebindung die Halbwertszeit beeinflusst. Beim Vergleich der Metabolisationsrate der von mir untersuchten 6 Sulfonamide (Ebel 1979) mit der Bindungsrate an Muskelhomogenat,

läßt sich keine signifikante Korrelation erkennen. Bei der Korrelation dieser 6 Substanzen mit den Werten ihrer biologischen Halbwertszeit (Ebel 1979), tritt ebenfalls kein Zusammenhang auf.

In Abbildung 5 ist der Zusammenhang der Bindung an Muskelgewebe des Menschen mit $A_e(\infty)$ dargestellt. $A_e(\infty)$ steht für den Anteil der im Urin unverändert ausgeschiedenen Substanzmenge bis zum Zeitpunkt unendlich.

Die Korrelation der Wertepaare von Alprenolol, Metoprolol, Propranolol, Phenylbutazon, Sulfinpyrazon und Sulfisoxazol ergibt einen Korrelationskoeffizienten nach Spearman von $r_s = 0,786$ $p < 0,05$.

Die Werte für $A_e(\infty)$ wurden dem Buch von Klotz (1984) entnommen.

Aufgrund der geringen Menge an untersuchten Substanzen, kann lediglich vermutet werden, daß eine umgekehrte Proportionalität der Bindung an Muskelgewebe zum Anteil der unverändert ausgeschiedenen Substanz besteht, die sich mit der Gleichung

$\log A_e(\infty) = - a \times \log B/F + b$ beschreiben läßt.

5) Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Ultrafiltration die Bindung von 14 Substanzen an menschliches Muskelgewebshomogenat bestimmt. Gemessen wurde die Bindung der 9 Säuren Sulfadimethoxin, Sulfamethoxydiazin, Sulfamethoxyipyridazin, Sulfamoxol, Sulfisomidin, Sulfisoxazol, Oxyphenbutazon, Phenylbutazon und Sulfinpyrazon, sowie der 5 Basen Alprenolol, Metoprolol, Pindolol, Propranolol und Toliprolol.

Die Bindung wurde bei einer Substanzkonzentration von 10^{-5} m für die Sulfonamide und die β -Blocker, 10^{-4} m für die Pyrazolone gemessen.

Beim Vergleich mit Werten aus der Literatur konnten folgende Zusammenhänge erarbeitet werden:

- 1) Es besteht ein enger Zusammenhang der Muskelhomogenatbindung des Menschen mit der des Kaninchens und der Ratte. Die Beziehung läßt sich mit $\log B/F_{\text{Mensch}} = a \times \log B/F_{\text{Tier}} + b$ ausdrücken.
- 2) Zwischen der Eiweißbindung an Muskelhomogenat und Plasma, jeweils beim Menschen, besteht kein Zusammenhang.
- 3) Die Muskelhomogenatbindung korreliert eng mit dem Verteilungskoeffizienten VK Puffer/Oktanol der gebundenen Substanz.
- 4) Das Verteilungsvolumen der freien Substanz steht in engem Zusammenhang mit der Muskelhomogenatbindung.

- 5) Es besteht kein Zusammenhang zwischen der biologischen Halbwertszeit $t_{1/2}$ und der Muskelhomogenatbindung.
- 6) Die Menge der unverändert (nicht metabolisiert) ausgeschiedenen Substanz im Urin bis zum Zeitpunkt unendlich in % ($Ae(\infty)$) korreliert mit der Muskelhomogenatbindung.

Die gefundenen Zusammenhänge der Muskelhomogenatbindung mit dem Verteilungsvolumen der freien Substanz (V_f) und $Ae(\infty)$ spiegeln die Bedeutung der Muskulatur, bei einem Anteil von 40 % am Körpergewicht, auf die Pharmakokinetik des Organismus, wider.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

Anderson, J.H., Anderson, R.C., Iben, L.S.

Hepatic uptake of propranolol

J. Pharmacol. Exp. Ther. 206, 172 - 180 (1978)

Anton, A.H.

The relation between the binding of sulfonamides to albumin and their antibacterial efficacy.

Journal of Pharmacology 129, 282 - 290 (1960)

Avery, G.S.

Drug Treatment; Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics.

ADIS Press Sydney and New York (1980)

Bittar, E.E.

Cell pH

Butterwords London (1974)

Bratton, A.C., Marshall, E.K.

A new coupling component for sulfonamid determination.

J. biol. Chem., 128, 537 - 550 (1939)

Brodie, B.B.

Pharmacological and clinical implications of drug transport.
In: Transport function of plasma proteins, ed.

P. Desgrez u. P.M. Traverse Elsevier, Amsterdam (1966)

v.Bruck,C.G., Kuhne,J.

Zur Bestimmung der Eiweißbindung von Sulfonamiden mittels der Ultrafiltermethode.

Arzneimittelforschung 12, 1116 - 1119 (1962)

Burns,J.J., Rose,R.K., Chenkin,T., Gollman,A.,

Schubert,A., Brodie,B.B.

The physiological disposition of phenylbutazon in man and a method for its estimation in biological material.

J. Pharmacol. 109, 346 - 357 (1953)

Conway,P., Valentovic,M., Bachman,K.

Tissue binding of warfarin.

Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 26, 309 - 315 (1979)

Craig,L.C., Ansevin,A.

Dialysis studies VI; experiments with amino acids.

Biochemistry 2, 1268 - 1271 (1963)

Dollery,C.T., Junod,A.F.

Concentration of (+)-propranolol in isolated, perfused lungs of rats.

Brit. J. Pharmacol. 57, 67 - 71 (1976)

Ebel,S.

Synthetische Arzneimittel

Verlag Chemie Weinheim - New York (1979)

Fichtl,B.

Untersuchungen zur Gewebefindung von Pharmaka.

Habilitationsschrift, München (1983)

Fichtl, B. Bondy, B. Kurz, H.

Binding of drugs to muscle tissue: dependence on drug concentration and lipid content of tissue.

J. Pharm. exp. Ther. 215, 248 - 253 (1980)

Fichtl, B. Kurz, H.

Bindings of drugs to human muscle.

Europ. J. Clin. Pharmacol. 14? 335 - 340 (1978)

Fichtl, B., Kurz, H.

Does determination of drug binding in homogenized tissue reflect binding in the intact organ?

Naunyn - Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 311, suppl., R3 (1980)

Filous, N.

Vergleich der Bindung von Pharmaka an Zwerchfellmuskel und an Zwerchfellmuskelhomogenat der Ratte.

Dissertation, München (1977)

Friemel, G.

Die Bindung von Arzneimitteln an die Plasmaproteine verschiedener Tierarten.

Dissertation, München (1968)

Ganong, W.F.

Lehrbuch der Medizinischen Physiologie.

Springer - Verlag; Berlin, Heidelberg, New York (1974)

Garn, F.W., Kimbel, K.H.

Verbleib und Ausscheidung von Depotsulfonamiden.

Arzneimittel-Forsch. 11, 701 - 707 (1961)

Gibaldi, M., Levy, G., Mc Namara, P.J.

Effect of plasmaprotein and tissue binding on the biological half-life of drugs.

Clin. Pharmacol. Ther. 24, 1 - 4 (1978)

Goodman, L.S., Gilman, A.

Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. 6th ed.

Macmillan Publishing Co., Inc. New York

Collier Macmillan Canada, LTD Toronto

Baillière Tindall London (1979)

Hansch, C., Leo, A.

Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology.

J. Wiley, New York - Chichester - Brisbane - Toronto (1979)

Igari, Y., Sugiyama, Y., Awazu, S., Hanano, M.

Comparative physiologically based pharmacokinetics of hexobarbital, phenobarbital and thiopental in the rat.

J. Pharmacokin. Biopharm. 10, 53 - 75 (1982)

Keen, P.M.

The binding of penicillins to bovine serum albumin.

Biochem. Pharmacol. 15, 447 - 463 (1966)

Keen, P.M.

Effect of binding to plasma proteins on the distribution activity and elimination of drugs.

In: Hdb. exp. Pharmacol. XXVIII/1 Kap. 10, 213 -233 (1971)

Springer Verlag; Berlin, Heidelberg, New York.

Klotz,U.

Klinische Pharmakokinetik 2. Auflage

Gustav Fischer Verlag; Stuttgart, New York (1984)

Kurz,H.

Einfluß der physikalisch - chemischen Eigenschaften von
Kurznarkotika auf den " hang - over ".

Arch. Pharmak. 255, 33 (1966)

Kurz,H. Friemel,G.

Artspezifische Unterschiede der Bindung an Plasmaproteine.

Naunyn.-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 257, 35 - 36 (1967)

Kurz,H. Trunk,H.

Some interfering factors in determining the protein-bound
fraction of chemotherapeutics.

Vortrag, V. Internationaler Kongress für Chemotherapie,
Wien (1967)

Kurz,H., Trunk,H., Weitz,B.

Evaluation of methods to determine protein-binding of
drugs.

Arzneimittel-Forsch./Drug Res. 27 (II) Nr. 7, 1373 - 1380
(1977)

Leo,A., Hansch,C., Elkins,D.

Partition coefficients and their uses.

Chem. Rev. 71, 525 - 616 (1971)

Lin, J.H., Sugiyama, Y., Awazu, S., Hanano, M.

In vitro and in vivo evaluation of the tissue-to-blood partition coefficient for physiological pharmacokinetic models.

J. Pharmacokin. Biopharm. 10, 637 - 647 (1982)

Ludden, T.M., Schanker, L.S., Lanman, R.C.

Binding of organic compound to rat liver and lung.

Drug. Metabol. Dispos. 4, 8 - 16 (1976)

Martin, B.K.

Potential effect of the plasma proteins on drug distribution.

Nature 207, 275 - 276 (1967)

Pacha, W.L.

A method for the fluorometric determination of 4-(2-hydroxy-3-isopropylaminopropoxy) indole (LB 46), a β -blocking agent, in plasma and urine.

Experientia 25, 802 (1969)

Renkin, E.M.

Filtration, diffusion and molecular sieving through porous cellulose membranes.

J. Gen. Physiol. 38, 225 - 243 (1955)

Rieder, J.

Bestimmung von Sulfonamiden.

Arzneimittel-Forsch. 13, 81 - 88 (1963)

Roos, A., Boron, W.F.

Intracellular pH.

Physiol. Rev. 61, 296 - 434 (1981)

Schach v.Wittenau,M., Yeary,R.

The excretion and distribution in body fluids of tetracyclines after intravenous administration to dogs.

J. Pharmacol. 140, 258 - 266 (1963)

Schanker,L.S., Morrison,A.S.

Physiological disposition of guanethidine in the rat and its uptake by heart slices.

Int. J. Neuropharmacol. 4, 27 - 39 (1966)

Scholtan,W.

Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper.

Arzneimittel-Forsch. 11, 707 - 720 (1961)

Scholtan,W.

Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper.

Arzneimittel-Forsch. 14, 469 - 473 (1964)

Scholtan,W.

Die hydrophobe Bindung der Pharmaka an Humanalbumin und Ribonukleinsäure.

Arzneimittel-Forsch. 18, 505 - 517 (1968)

Seydell,J.K., Schaper,K.J.

Quantitative structure-pharmacokinetic relationship in drug design.

Pharm. Ther. 15, 131 - 182 (1982)

Shand,D.G., Nuckolls,E.M., Oates,J.A.

Plasma propranolol levels in adults.

Clin.Pharmacol. Ther. 11, 112 - 115 (1969)

Sheik,M.I.

Renal handling of phenol red.

J. Physiol. (London) 227, 565 - 590 (1972)

Shen,D., Gibaldi,M.

Critical evaluation of use of effective protein fractions
in developing pharmacokinetic models for drug distribution.

J. pharm. Sci. 63, 1698 - 1703 (1974)

Smith,R.N., Hansch,C., Ames,M.M.

Selection of reference partitioning system for drug
design work.

J. pharm. Sci. 64, 599 - 606 (1975)

Stock,K., Westermann,E.

Quantitative estimation and tissue distribution of
Kö 592 1-(3-Methylphenoxy)-3-Isopropylamino-propanol(2)-
hydrochloride, a new sympathetic β -Receptor blocking agent.

Biochem. Pharmacol. 14, 227 - 236 (1965)

Thorp,J,M.

The influence of plasma proteins on the action of drugs.
In: ed. T.B. Binns Adsorption and distribution of drugs.
64 - 76 (1964) Livingstone Ltd.
Edinburgh u. London

Waddel,W.J., Bates,R.G.

Intracellular pH.

Physiol. Rev. 49, 285 - 329 (1969)

Weder, H.J., Bickel, M.H.

Interactions of drugs with proteins II: Experimental methods, treatment of experimental data and thermodynamics of binding. Reactions of thymoleptic drugs and model dyes.

J. pharm. Sci. 59, 1563 - 1569 (1970)

Willbrandt, W.

Membrane structure and selective permeability.

J. Gen. Physiol. 18, 933 (1935)

Wosilait, W.D.

The accumulation and distribution of dicumarol in rat liver slices.

Biochem. Pharmacol. 17, 425 - 437 (1968)

L e b e n s l a u f

Hubert Ludwig Berktold

geboren am 25.1.1959 in
Immenstadt/Allgäu als erster
von 4 Söhnen des Schuhmacher-
meisters Ludwig Berktold
und seiner Ehefrau Balbina
Berktold, geb. Uth.

Schulen

1965 - 1969 Grundschule Burgberg
1969 - 1978 Gymnasium Oberstdorf
Reifeprüfung: Juni 1978

Berufsausbildung

Seit SS 79 Studium der Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Univer-
sität München

Ärztliche Vorprüfung: März 1981
Erster Abschnitt der Ärztlichen
Prüfung März 1982

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen
Prüfung März 1984

Dritter Abschnitt der Ärztlichen
Prüfung April/Mai 1985

Seit 2.12.85 als Zivildienst-
leistender Arzt an der Staatlichen
Orthopädischen Klinik München-
Harlaching.

